

ANALISIS GENETIK MOLEKUL PESAKIT SINDROM
FRAGILE X DI HOSPITAL
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA (HUSM)

MOHAMAD ROS SIDEK

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2006

ANALISIS GENETIK MOLEKUL PESAKIT SINDROM
FRAGILE X DI HOSPITAL
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA (HUSM)

Oleh

MOHAMAD ROS SIDEK

Tesis yang diserahkan untuk
memenuhi keperluan bagi Ijazah
Sarjana Sains

2006

DEDIKASI

Ditujukan khas buat ayah bonda tercinta dan isteri tersayang Rohani binti Omar. Sesungguhnya hanya Allah sahaja yang mampu membalas jasa dan budi baik kalian, yang sentiasa mendoakan kesejahteraan dan kejayaan saya dalam pengajian ini seterusnya menyiapkan tesis ini. Dan untuk anak-anak tersayang, Nur Syakirah, Nur Syarah, Umairah dan Kauthar abah sentiasa mendoakan agar kalian akan membesar dalam suasana limpahan kasih sayang dari kami abah dan ummi dan semoga Allah merahmati kalian untuk membesar dan menjadi insan yang utuh imannya serta menjadi insan yang solehah wa musleh.

Semoga Allah membalas segalanya dengan natijah kebaikan yang setimpal, Insya Allah.

PENGHARGAAN

Dengan lafaz Alhamdulillah saya mengucapkan segala puji dan syukur kepada Ilahi kerana dengan izin dan rahmatNya, kajian dan penulisan tesis ini dapat disempurnakan. Sekalung penghargaan dan ucapan terima kasih yang tidak terhingga saya huluskan buat penyelia utama saya Prof Mohd Nizam Hj Isa dan juga penyelia bersama Dr Wan Asma Ismail yang telah banyak dan tanpa bosan memberi bimbingan, tunjuk ajar dan nasihat serta ruang masa semata-mata bagi memastikan kajian ini dapat disempurnakan dengan jayanya.

Tidak lupa juga saya ingin mengucapkan berbanyak terima kasih kepada pihak pengurusan Universiti Sains Malaysia khususnya Naib Canselor kerana telah memberi sokongan penuh kepada saya sebagai staf di Universiti Sains Malaysia menjalankan kajian ini. Juga tidak dilupakan ucapan terima kasih kepada Dekan Pusat Pengajian Sains Perubatan, Prof Zabidi Azhar Mohd Hussin yang telah memberi sokongan, bantuan dan tolak ansur kepada saya sepanjang saya menjalankan kajian ini.

Begitu juga ucapan terima kasih saya huluskan kepada Pengarah Pusat Genom kerana mengizinkan saya menggunakan kemudahan dan masa bagi saya menjalankan kajian ini. Juga kepada semua staf Pusat Genom Manusia, Kak Siti, Kak Ann, Kak Yah, Encik Tarmizi, Nik, Ida, Shima, Za, Azam, Azlina, Khai, Aziz, Along, Yulia, Ja, Su, Bad, Ijan, Ku, Fini, Boon Pheng dan Nizam, segala bantuan anda sangat saya hargai dan moga mendapat balasan setimpal dari Tuhan.

Akhir kata semoga Allah memberkati segala ilmu dan pengalaman yang diperoleh sepanjang menjalankan kajian ini. Terima kasih.

SENARAI PEMBENTANGAN KERTAS KERJA

Penerbitan Jurnal.

MZ Fuziah, M Ros Sidek, SR Fatimah, NA Atifah, MN Isa. (2000). The application of SRY gene in aiding sex assignment and/or reassignment of sexual ambiguity. J.Paediatric Endo.& Metabolism.pp 1190. Vol.13 Suppl. 3.

Isa M.N., Yusoff A.A., Sidek M.R., Abdullah J.M. Non-isotopic PCR-cold SSCP of p53 gene mutations in Gliomas using the Dcode System. Asia Pacific J Mol Biol & Biotechnol 2001;9(2): 107-110.

M.Ros Sidek, Ismail W.A. and Isa M.N (2003). Strong Founder Effect of FMR1 haplotypes among unrelated Malay individuals in East Coast of West Malaysia. Proceedings of the 5th National Congress of Genetics, Malaysia 25-27th March 2003 Kuala Lumpur, Malaysia.

Pembentangan Kertas Kerja Oral.

BP Riley., M.Mogudi-Carter., MS Razali.,M.Ros Sidek, MN ISA., TJ Jemkins., R. Williamson., DA Collier and RM Murray.(1997). Replication of suggestive evidence linking the alfa-7-Nicotic cholinergic receptor gene on chromosome 15q13-q14 to schizophrenia in Bantu and Malay families. International Congress on Psychiatry, New Mexico, USA (14 - 20th. October 1997).

MY Narazah., M Matsuo., A.Haryanto., NA Zahari., M.Ros Sidek, G Selamah., SR Fatimah ., T Ishida., J Normah., MN ISA. (1997). Detection of deleted erythrocytes band 3 gene in South East Asia Ovalocytosis in Hospital Universiti Sains Malaysia . Third National Conference on Medical Sciences, 25-26 May 1997, USM, Kelantan. Malaysia.

MZ Fuziah, C Jeyabalan, M.Ros Sidek, SF Ramli, MN ISA. (1999). Sex determining region on Y chromosome (SRY gene) as a complementary clinical tool for investigation of ambiguous genitalia in a newborn. 5th National Conference of Medical Sciences, 4th –5th May 1999. USM Kelantan, Malaysia.

Pembentangan Kertas Kerja Poster.

M. Ros Sidek, NA Atifah, SR Fatimah, A Aziz, Khairani M. A Asma. MN Isa. (2000). A non-isotopic polymerase chain reaction (PCR) based technique for the identification of Fragile-X. Proc. 12th National Biotechnology Seminar. 12-15th Nov. 2000, Lumut, Perak. Malaysia. pp. 615-616.

SR Fatimah., M.Ros Sidek, HV Rostenberg., SP Ram., MR Rowani., MY Narazah., MN ISA. (1997). Fishing the numerical aberrations in poor metaphase preparation. Third National Conference on Medical Sciences, 25-26 May 1997, USM, Kelantan. Malaysia.

MN ISA, J Abdullah, M.Ros Sidek, SF Ramli, A Adam. (1999). Detection of p53 gene mutation using non-radioactive PCR-SSCP in cases of meningiomas and gliomas in East coast of Malaysia. Human Genome Meeting (HGM '99). 27th -30th March, Brisbane, Australia

M.Ros Sidek., SF Ramli., N Adam., J Abdullah., MN ISA. (1999). Non-radioactive PCR_SSCP for detection of p53 gene mutation in brain tumour: A preliminary result. 5th National Conference of Medical Sciences, 4th –5th May 1999. USM, Kelantan, Malaysia.

MZ Fuziah., MN ISA, M.Ros Sidek., SF Ramli., C Jeyabalan., JA Wahab. (1999) SRY gene identification as a complementary tool in gender assignment and management of ambiguous genitalia. Asia Pacific Paediatrics Endocrine Society (APPEs), 1st–3rd July 1999, Kuala Lumpur, Malaysia.

N Atifah Adam, SF Ramli, M. Ros Sidek, BA Falil, KI Mokhtar. AA Yusof. AN Ismail, WA Bakar, MN ISA (1999). Isochromosome 21 in the newborn of a balanced carrier mother of chromosome 21 (isochromosome 21). MIMLS 10th National Scientific Conference, 11-12th Oct 1999. Kuala Lumpur.

N Atifah Adam, AA Yusof, SF Ramli, M.Ros Sidek, KI Mokhtar, J Abdullah, MN ISA (1999). Analysis of p53 gene mutations using non-isotopic radioactive PCR-SSCP in cases of gliomas and meningiomas in East Coast of Malaysia. MIMLS 10th National Scientific Conference, 11-12th Oct 1999. Kuala Lumpur.

J Abdullah., M.Ros Sidek., MN ISA. (1999). Non-radioactive PCR-SSCP for the detection of p53 gene mutation in brain tumour. Congress of Neurological Surgeons. 49th Annual Meeting. Boston, Massachusetts. October 30th-4th Nov. 1999.

SR Fatimah, Ismail AN, Bakar WA, NA Atifah M Ros Sidek, MN Isa. (2000). Delineation of chromosome 21 in a woman with recurrent abortion. Proc. 12th National Biotechnology Seminar. 12-15th Nov. 2000, Lumut, Perak. Malaysia. pp.224

M. Ros Sidek, NA Atifah, SR Fatimah, A Aziz, Khairani M. A Asma. MN Isa. (2000). A non-isotopic polymerase chain reaction (PCR) based technique for the identification of Fragile-X. Proc. 12th National Biotechnology Seminar. 12-15th Nov. 2000, Lumut, Perak. Malaysia. pp. 615-616.

S Sulong., AA Yussof., N Zainuddin., M.Ros Sidek., SF Ramli., N Adam., J Abdullah., MN Isa. (2001). Deletion of the multiple tumor suppressor gene 1 (MTS1/p16) at exon 2 in the progression of human gliomas in east coast of West Malaysia. 1st Asean Conferences in Medical Sciences. Kelantan, Malaysia.

M.Ros Sidek., WA Ismail., SF Ramli., NA Adam., MN Isa. (2001). Analysis of (CA) allele repeats on the FRAXAC1 locus in normal Malay population. 1st Asean Conferences in Medical Sciences. Kelantan, Malaysia.

M.Ros Sidek., Z Suhaili., Sharifah AI., MN Isa. (2001). Analysis of 22q11 deletion using microsatellite DNA marker. 1st Asean Conferences in Medical Sciences. Kelantan, Malaysia.

YK Muhamad., MZ Fuziah., R Anida., M. Ros Sidek., SF Ramli., N Adam., MN Isa. Molecular analysis in gender assignment and management of ambiguous genitalia. 1st Asean Conferences in Medical Sciences. Kelantan, Malaysia. (Poster presentation).

SF Ramli., N Hazlina., N Adam., M.Ros Sidek., M Shukri., MN Isa. (2001). Primary male infertility with 47,XXY. 1st Asean Conferences in Medical Sciences. Kelantan, Malaysia.

AA Yusoff., M. Ros Sidek., SF Ramli., N Adam., KI Mokhtar., J Abdullah., MN Isa. (2001). p53 gene mutations in glioma patients in Malaysia. 1st Asean Conferences in Medical Sciences. Kelantan, Malaysia.

N Zainuddin., M. Ros Sidek., SF Ramli., N Adam., KI Mohktar., AA Yusoff., J Abdullah., MN Isa (2001). Loss of heterozygosity on chromosome 10q in east coast of Malaysian patients with gliomas. 1st Asean Conferences in Medical Sciences. Kelantan, Malaysia.

MN Isa., AA Yusoff., M.Ros Sidek., SF Ramli., NA Adam., KA Mohktar., J Abdullah. (2001). p53 mutations detected in glioma patients in Malaysia. Manuscript. 12th Congress of Neurosurgery.

SENARAI KANDUNGAN

Kandungan

TAJUK

DEDIKASI	iii
PENGHARGAAN	iv
SENARAI PEMBENTANGAN KERTAS	v
SENARAI KANDUNGAN	ix
SENARAI JADUAL	xii
SENARAI GAMBAR RAJAH	xiii
SENARAI KEPENDEKAN KATA	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvii
 BAB 1 : PENGENALAN	 1
1.1 Latar belakang kajian.	1
1.2 Sindrom Fragile X.	3
1.2.1 Kajian awal.	3
1.2.2 Ciri-ciri fenotip.	5
1.2.3 Corak pewarisan.	11
1.3 Struktur dan fungsi gen Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1)	13
1.4 Mutasi yang menyebabkan sindrom Fragile X.	19
1.4.1 Peningkatan jujukan ulangan trinukleotida	19
1.4.2 Mekanisma mutasi yang menghasilkan peningkatan jujukan ulangan CGG	21
1.4.3 Mutasi jujukan berulang dinukleotida (mikrosatelit) yang berdekatan dengan gen FMR1	23
1.4.4 Bentuk mutasi lain pada gen FMR1	25
1.4.5 Pemetilan hiper dan penyahaktifan gen FMR1	25
1.4.6 Ketidakstabilan somatik jujukan ulangan CGG	27
1.5 Diagnosis makmal sindrom Fragile X.	28

1.5.1 Ujian sitogenetik pada FRAXA	28
1.5.2 Analisis mutasi langsung (Analisis DNA Molekul)	31
1.5.3 Peningkatan jujukan Ulangan Trinukleotida CGG	34
1.6 Genetik populasi sindrom Fragile X	35
1.7 Objektif kajian	39
 BAB 2 : BAHAN DAN KAEDAH	 40
2.1 Subjek kajian	40
2.1.1 Pesakit sindrom Fragile X dan ahli keluarga	40
2.1.2 Subjek kawalan.	40
2.1.3 Pengambilan sampel darah periferi.	40
2.2 Ujian sitogenetik	
2.2.1 Penyediaan media kultur dan reagen	41
2.2.2 Pengkulturan sel limfosit	41
2.2.3 Penetapan kultur sel pada tahap metafasa mitotik	42
2.2.4 Penuaian sel dan penyediaan slaid.	42
2.2.4.1 Penyediaan Bahan Larutan dan Fiksatif	42
2.2.5 Pewarnaan slaid	44
2.2.6 Penyaringan sebaran metafasa.	46
2.3 Penyediaan Sampel DNA.	47
2.3.1 Penyediaan bahan dan reagen.	47
2.3.1.1 Larutan Lisis Sel Darah Merah (RCLB)	47
2.3.1.2 Larutan 6M Natrium klorida	47
2.3.1.3 Larutan 10% SDS	48
2.3.1.4 Larutan penimbal STE (Sodium-Tris-EDTA).	48
2.3.1.5 Larutan penimbal Tris-EDTA (TE)	48
2.3.1.6 Larutan 70% Etanol.	49
2.3.1.7 Larutan Proteinase K	49
2.4 Pengekstrakan DNA genomik	50
2.5 Pengukuran kualiti dan kuantiti DNA yang diekstrak	52
2.6 Elektroforesis gel agarosa DNA genomik.	52
2.6.1 Penyediaan larutan tampan TBE 10X	52
2.6.2 Penyediaan larutan TBE 1X	53
2.6.3 Penyediaan larutan penimbal berat (<i>6X loading buffer</i>)	53
2.6.4 Penyediaan gel agarosa 1%.	53
2.7 Analisis mutasi langsung.	
2.7.1 Pemotongan DNA genomik dengan enzim penyekat.	54

2.7.2 Pemindahan DNA daripada gel agarosa ke membran	55
2.7.3 Penyediaan prob DNA	55
2.7.4 Hibridasi dan pengenalpastian DNA genomik dengan prob DNA	55
2.7.5 Amplifikasi DNA dengan kaedah PCR.	56
2.7.5.1 Amplifikasi jujukan ulangan CGG pada gen FMR1	56
2.7.5.2 Amplifikasi jujukan mikrosatelit FRAXAC1	57
2.7.5.3 Amplifikasi jujukan mikrosatelit DXS548	58
2.7.5.4 Elektroforesis gel agarosa produk PCR	59
2.7.5.5 Elektroforesis kapilari	59
2.8 Penjujukan DNA.	59
2.9 Analisis haplotaip	60
BAB 3 : KEPUTUSAN	61
3.1 Analisis sitogenetik.	61
3.2 Analisis mutasi langsung.	63
3.2.1 DNA genomik yang diekstrak daripada darah	63
3.2.2 Analisis Amplifikasi dan Taburan Jujukan Ulangan CGG	65
3.2.3 Analisis Pemblotan Southern	71
3.2.4 Analisis Penanda Mikrosatelit FRAXAC1 dan DXS548	72
3.3 Analisis alel FRAXAC1 dan DXS548	73
BAB 4 : PERBINCANGAN	83
4.1 Diagnosis sindrom Fragile X	83
4.2 Corak pewarisan sindrom Fragile X dalam populasi kajian	87
4.2.1 Taburan jujukan ulangan CGG dalam populasi normal kajian.	87
4.2.2 Taburan Alel FRAXAC1 dan DXS548	88
BAB 5 KESIMPULAN	91
RUJUKAN	94
LAMPIRAN	115

SENARAI JADUAL

Jadual		Muka surat
Jadual 3.1	Taburan bilangan ulangan CGG dalam individu normal	69
Jadual 3.2	Standard Penamaan Alel/Genotip Penanda Mikrosatelit gen FMR1	76
Jadual 3.3	Frekuensi taburan alel-alel FRAXAC1 dan DXS548 dalam bagi individu normal dan pesakit sindrom Fragile X.	77
Jadual 3.4	Analisis haplotaip (DXS548-FRAXAC1) di kalangan individu normal berbanding pesakit sindrom Fragile X.	80
Jadual 3.5	Analisis haplotaip (DXS548-FRAXAC1) di kalangan individu normal dalam beberapa populasi berlainan.	82

SENARAI GAMBAR RAJAH

Gambar Rajah		Muka surat
1.1	Struktur dan organisasi gen FMR1	15
1.2	Kromosom X dan lokasi gen FMR1 pada lokus Xq27.3	17
1.3	Mekanisma mutasi dalam sindrom Fragile X	18
1.4	Lokasi penanda haplotaip yang digunakan dalam kajian.	24
3.1	Sebaran kromosom metafasa yang dilihat di bawah mikroskop (100X pembesaran)	61
3.2	Kariotip pesakit lelaki sindrom Fragile X (46,XY,(x)(q27.3).	62
3.3	DNA genomik yang telah di ekstrak dari sampel darah.	64
3.4	Hasil amplifikasi PCR jujukan ulangan CGG pada sampel kajian yang terdiri daripada individu lelaki normal.	66
3.5	Analisis elektroforesis kapilari pendaflour ke atas produk PCR yang positif hasil amplifikasi lokus FRAXA (CGG).	67
3.6	Carta bar menunjukkan taburan jujukan ulangan CGG individu normal yang dikaji.	70
3.7	Ujian Pemblotan Southern ke atas sampel kajian yang disyaki mengalami mutasi penuh dan sampel normal.	71
3.8	Gel agarosa selepas elektroforesis hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan DNA sampel kajian, ke atas dua lokus mikrosatelit FRAXAC1 dan DXS548 yang terhasil dari dua tindak balas PCR yang berbeza.	72
3.9	Analisis elektroforesis kapilari pendaflour ke atas produk PCR yang positif hasil amplifikasi lokus FRAXAC1.	74
3.10	Analisis elektroforesis kapilari pendaflour ke atas produk PCR yang positif hasil amplifikasi lokus DXS548.	75

SENARAI KEPENDEKAN KATA

bp	<i>base pair</i> atau pasangan bes
BudR	5-bromodeoxy-uridine
CGG	triplet gabungan nukleotida sitosin guanida guanida
CI	confidence interval
CpG	kawasan dalam jujukan DNA yang kaya dengan nukleotida C (<i>cytosine</i>) dan G (<i>guanine</i>)
CVS	<i>chorionic vilus sampling</i>
EEG	<i>Electroencephalogram</i>
FAM	<i>Carboxyfluorescein</i>
FMR1	simbol gen <i>Fragile X Mental Retardation 1</i>
FMR2	simbol gen berkaitan dengan lokus FRAXE (<i>Fragile Mental Retardation 2</i>)
FMRP	protein hasil pengekpesan gen FMR1
FRAXA	tapak rapuh pada kromosom X iaitu tXq27.3 yang dikaitkan dengan jujukan trinukleotida CGG pada gen FMR1
FRAXD	Tapak rapuh pada kromosom di lokus Xq27.3–28
FRAXE	Tapak rapuh pada kromosom di lokus Xq28 yang terlibat dalam peningkatan ulangan pada gen FMR2
FRAXF	Tapak rapuh pada kromosom di lokus Xq27.3–28
FudR	2' deoxy 5 fluorouridine
HEX	<i>hexachlorinated analog of FAM (Carboxyfluorescein)</i>
NED	N- ester, phosphoramidite hydroxysuccinimidyl
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
POF	<i>Premature Ovarian Failure</i>
SEN	Sentromer
TEL	Telomer
UTR	<i>Untranslated region</i>

ABSTRAK

Sindrom Fragile X merupakan salah satu penyakit pewarisan yang paling kerap menyebabkan keadaan kerencatan akal. Penyakit ini berlaku disebabkan oleh peningkatan jujukan trinukleotida ulangan (CGG) yang terletak dalam kawasan 5' UTR gen FMR1 dan mengakibatkan perencatan fungsi gen ini. Sindrom ini juga dikaitkan dengan fenomena tapak rapuh yang berlaku pada hujung lengan q kromosom X akibat sifat sensitif kepada asid folik yang terletak pada kromosom X (Xq27.3) atau simbolnya (FRAXA). Kajian ini dilakukan untuk menganalisis taburan alel FRAXA dalam populasi lelaki normal, pesakit dan ahli keluarga pesakit sindrom Fragile X orang Melayu di Kelantan. Taburan alel FRAXA dibandingkan dengan populasi lain. Analisis struktur jujukan ulangan trinukleotida (CGG)_n pada gen FMR1 dan lokus mikrosatelit berhampiran kawasan ini turut dilakukan. Sejumlah 142 sampel darah digunakan dalam kajian ini yang terdiri daripada 69 individu lelaki normal, 48 sampel yang terdiri daripada pesakit terencat akal yang disyaki menghidap sindrom Fragile X dan 25 sampel daripada ahli keluarga mereka. Ujian sitogenetik hanya dilakukan kepada sampel pesakit sindrom Fragile X yang disaring secara klinikal bagi mengenal pasti kewujudan tapak rapuh pada hujung q kromosom X (Xq27.3). Ujian genetik molekul dilakukan terhadap kesemua sampel kajian termasuk daripada individu normal.

Melalui ujian sitogenetik, hanya 2 sampel (4.17%) menunjukkan tapak rapuh pada hujung kromosom X (Xq27.3) daripada 48 sampel yang dikaji. Sebanyak 73 sampel kajian terdiri daripada sampel pesakit terencat akal dan ahli keluarga diuji dengan kaedah PCR bagi menentukan bilangan jujukan ulangan trinukleotida (CGG). 18 sampel (37.50% daripada sampel pesakit) gagal diamplifikasi dan berkemungkinan mengalami mutasi penuh. 55 sampel (75.34% daripada 73 sampel kajian) menunjukkan saiz ulangan jujukan trinukleotida (CGG) bervariasi. Taburan jujukan

ulangan trinukleotida (CGG) di kalangan 69 orang individu lelaki normal didapati berbeza dengan beberapa kajian yang telah dilakukan dalam populasi lain. Keadaan ini berkemungkinan disebabkan wujudnya mutasi baru dalam populasi yang dikaji. Analisis terhadap taburan alel FRAXAC1 dan DXS548 menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan di antara individu normal dan pesakit sindrom Fragile X. Ini menunjukkan tiada kesan alel pengasas (*founder effect*) diperhatikan dalam populasi kajian. Namun begitu analisis haplotaip (DXS548-FRAXAC1) menunjukkan perbezaan yang signifikan di antara individu normal dan pesakit Sindrom Fragile X, menunjukkan kehadiran 'haplotaip pelindung' dan 'haplotaip pengasas' dalam populasi kajian. Hasil yang diperoleh daripada kajian ini menyimpulkan bahawa ujian genetik molekul sesuai dan boleh dilakukan di Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM). Kajian ini juga mencadangkan agar satu projek penyaringan perlu dilakukan di kalangan pesakit terencat akal bagi menentukan punca sebenar penyakit tersebut dan akan dapat membantu ahli keluarga serta pihak hospital merangka kaedah pengurusan pesakit sindrom Fragile X dan ahli keluarga yang terlibat dengan lebih efektif. Hasil kajian ini juga dapat dibangunkan di HUSM bagi tujuan diagnosis dan menyokong kaunseling genetik Sindrom Fragile X.

ABSTRACT

Fragile X syndrome is one of the most common inherited genetic disorders that cause mental retardation. This disease results from the expansion of a trinucleotide repeat (CGG)_n sequences, located in the 5' UTR of FMR1 gene, that further inactivate the normal function of this gene. It is also associated with the expression of folate sensitive fragile site at the q arm of chromosome X, at locus Xq27.3 or FRAXA. This study was done to analyze the distribution of FRAXA alleles in Kelantan's Malay population consist of normal male, fragile X patients and their family members. The distribution of FRAXA alleles was studied and compared with other population. Analysis of trinucleotide repeats (CGG)_n structure and microsatellite loci located nearby were done. A total of 142 samples were analyzed. The samples were obtained from 69 normal males as normal control, and 73 samples which consist of 48 fragile X syndrome patient's and 25 family members were analyzed. In order to analyze the existence of fragile site at the q arm of chromosome X (Xq27.3), cytogenetics analysis were done on samples obtained from individuals whom were clinically confirmed of Fragile X syndrome. Molecular genetics tests were done on all samples.

Results of cytogenetics test showed that only 2 (4.17%) out of 48 samples studied have the fragile site. 73 samples from fragile X syndrome patients and their family members were tested using PCR to determine the repeat number of trinucleotide repeat (CGG)_n sequence. 18 samples (37.50% of patients) were failed to be amplified, suggested that the samples may have a full mutation allele, and 55 remaining samples (75.34% of 73 samples studied) showed variable number of (CGG)_n repeats. The distribution of trinucleotide (CGG)_n repeat sequences among normal male in this study was found to be difference from several findings in other populations, and this may suggest the

occurrence of new mutation in this population. Analysis of RFAXAC1 and DXS548 alleles distribution showed no significant difference between normal and fragile X samples. This may suggest that no founder effect was found in this population. The haplotypes analysis (DXS548-FRAXAC1) showed significant difference between normal and fragile X samples and also suggested the existence of protector haplotypes or founder haplotypes in this population.

Results obtained from this study demonstrated that the molecular genetic test is suitable and possible to be used in the diagnosis of Fragile X syndrome in Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM). We would also like to suggest that a screening program to study the causes of mental retardation among patients in HUSM as well as to help their family members or hospital to plan suitable effective patient management system, need to be established. The results of this study also will enable us to establish the diagnosis method for Fragile X syndrome as well as to compensate the genetic counseling process.

BAB 1 PENGENALAN

1.1 Latar belakang kajian.

Kajian terhadap penyakit kerencatan akal yang telah dilakukan pada peringkat populasi mendapati kira-kira 1 - 3% populasi di negara maju (Mercer, 1973; Jacobson dan Janicki, 1983; Roeleveld *et al.*, 1997; Aicardi 1998) dan 2-3% di negara membangun (Leonard *et al.*, 2002) menghidapi penyakit ini. Manakala kajian oleh Batshaw (1997), mendapati kekerapan berlaku penyakit kerencatan akal adalah 25 kali lebih tinggi daripada penyakit kebutaan mata. Seseorang individu itu dianggap sebagai terencat akal apabila tahap ujian kecerdasan (IQ) mempunyai nilai kurang daripada 70-75 dan ia boleh berlaku pada individu tanpa mengira bangsa, kumpulan etnik, tahap pelajaran (keluarga) atau keadaan sosioekonomi (Luckasson *et al.*, 1992). Terdapat beberapa punca yang boleh menyebabkan kerencatan akal dan sebahagian besar (sehingga 60%) keadaan ini berlaku akibat punca yang berasaskan genetik (Moser, 1995).

Beberapa kajian epidemiologi menunjukkan kejadian kerencatan akal berlaku lebih tinggi pada individu lelaki berbanding individu perempuan (McGuffin *et al.*, 1994). Perbezaan kekerapan ini mungkin berlaku disebabkan oleh ciri penyakit ini yang bersifat terangkai kromosom X dan dikenali sebagai *X-linked mental retardation* atau ringkasnya XLMR (Claes *et al.*, 1996). Kekerapan berlakunya kes-kes XLMR dianggarkan sebanyak 1/600 kelahiran individu lelaki (Herbst dan Miller, 1980; Opitz dan Sutherland 1984), dan daripada keseluruhan kes ini kira-kira 25-40% adalah merupakan kes sindrom Fragile X (Sutherland dan Hecht, 1985). Nilai kekerapan kes XLMR didapati sedikit bertambah iaitu satu bagi setiap 550 individu lelaki, namun kekerapan kejadian sindrom Fragile X berkurangan iaitu hanya 15% daripada keseluruhan kes XLMR (Gendrot *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 1996).

Kajian ini dilakukan dengan mengambil kira faktor genetik sebagai penyebab kepada keadaan kerencatan akal khususnya di kalangan pesakit sindrom Fragile X yang telah didiagnosis secara klinikal di Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM). Sindrom Fragile X dipilih kerana ia merupakan penyakit genetik yang boleh diwarisi (*inherited*) dan paling kerap menyebabkan keadaan kerencatan akal (Fu *et al.*, 1991). Pesakit akan menunjukkan ciri-ciri klinikal yang pelbagai sama ada kerencatan akal yang sederhana hinggalah ke tahap yang parah. Ciri-ciri fizikal yang paling kerap dilihat pada pesakit sindrom ini ialah kerencatan akal, muka dismorfik, dan pengekspresian tapak rapuh pada kromosom X, pada lokus Xq27.3 [Martin and Bell, 1943; Lubs, (1969); diungkap dalam Pembrey *et al.*, 2001; Sutherland, 1977; Sutherland and Ashford, 1979; Sherman *et al.*, 1985; Chakrabarti and Davies, 1997; dan Kooy, *et al.*, 2000]. Pesakit perempuan yang heterozigos pada umumnya cenderung untuk menunjukkan ciri-ciri klinikal yang sederhana atau kadang-kadang tidak menunjukkan sebarang ciri (Opitz and Sutherland 1984).

Corak pewarisan sindrom ini menunjukkan ciri terangkai kromosom X (*X-linked*) yang kompleks dan unik (Sherman *et al.*, 1984, 1985). Ia dikaitkan dengan pengekspresian tapak rapuh yang sensitif-asid folik pada kromosom X di lokus Xq27.3 (FRAXA). Sindrom Fragile X termasuk dalam kumpulan penyakit warisan yang disebabkan oleh mutasi melalui peningkatan ulangan jujukan trinukleotida (CGG) yang tidak stabil dan berterusan. Secara khusus, peningkatan ini berlaku pada kawasan tidak diterjemahkan 5' gen '*Fragile X mental retardation 1*' atau FMR1 (Oberlê *et al.*, 1991a, Verkerk *et al.*, 1991), dalam kawasan ekson 1 gen FMR1 dan boleh dikelaskan sebagai pramutasi atau mutasi penuh berasaskan kepada bilangan ulangan CGG (Fu *et al.*, 1991, Rousseau *et*

al., 1991, dan Yu *et al.*, 1992), mendapati majoriti kes Fragile X berlaku disebabkan oleh penyahaktifan gen FMR1 akibat peningkatan ketara jujukan ulangan CGG dan dikaitkan dengan keadaan hipermetilasi pulau CpG yang terletak dengan kawasan tersebut.

1.2 Sindrom Fragile X.

1.2.1 Kajian awal.

Kajian pertama (Martin and Bell, 1943) yang dicatatkan melibatkan sindrom Fragile X telah dilakukan ke atas 7 orang ahli keluarga yang mempunyai penyakit kerencatan akal terangkai kromosom-X yang menunjukkan ciri-ciri tipikal pada muka dan ciri makroorkidisma yang kemudiannya dicadangkan sebagai sindrom Martin-Bell (Richards *et al.*, 1981). Kajian berikutnya oleh Lubs, (1969) hanya dilakukan selepas 25 tahun kajian pertama dibuat. Kajian ini mendapati sejumlah 178 penyakit yang berlainan yang dikaitkan dengan keadaan terangkai kromosom X, yang mana ciri terencat akal merupakan kriteria asas pemilihan mereka. Hasil daripada penemuan yang telah dibuat dalam kajian ini beliau telah dianggap sebagai orang yang pertama menerangkan tentang penanda sitogenetik bagi sindrom Fragile X atau [kromosom fra(X)], yang beliau temui pada individu yang menghidap sindrom ini (Pembrey *et al.*, 2001).

Sindrom Fragile X wujud sebagai suatu entiti tersendiri di kalangan penyakit terencat akal terangkai kromosom X dan dianggap sebagai penyebab utama kepada majoriti kes yang dikenal pasti di kalangan pesakit lelaki pradominan (Opitz dan Sutherland 1984). Berasaskan kepada kajian yang dilakukan ke atas populasi pesakit terencat akal, kira-kira 4 – 8% adalah terdiri daripada pesakit lelaki yang mempunyai tahap kecerdasan

(IQ) kurang daripada 70 markah (Kahkonen *et al.*, 1987). Namun begitu satu kajian (Sutherland, 1977) telah berjaya mengesahkan kaitan kerencatan akal dengan tapak rapuh Xq27.3 melalui kajian beliau ke atas beberapa keluarga pesakit sindrom Fragile X. Kajian beliau berikutnya (Sutherland dan Ashford, 1979) telah berjaya membangunkan kaedah sitogenetik bagi mengenal pasti penanda kromosom atau simbolnya fra(X). Penemuan ini telah menerbitkan nama sindrom Fragile X berasaskan kepada ciri tapak rapuh yang sensitif kepada asid folik pada lokus Xq27.3 kromosom X (FRAXA). Tapak ini dapat dilihat sebagai suatu bahagian yang mengecut dan tidak diwarnakan jika kromosom diwarnakan dengan kaedah pewarnaan penjaluran Giemsa, dan secara fizikalnya ia terletak pada hujung distal lengan panjang (q) kromosom X (Sutherland and Hecht, 1985).

Kajian telah menunjukkan bahawa sindrom Fragile X dianggap sebagai sindrom yang menyebabkan kerencatan akal dan boleh diwariskan yang paling kerap ditemui dalam kesemua bangsa dan populasi (Fu *et al.*, 1991). Diagnosis sitogenetik ke atas sindrom (FRAXA) ini pada mulanya menjangkakan kekerapan penyakit ini adalah 1/200 – 1/2600 orang bagi pesakit lelaki dan 1/1600 – 1/2400 orang, bagi pesakit perempuan (Turner *et al.*, 1986, Webb *et al.*, 1986, Kahkonen *et al.*, 1987). Namun begitu diagnosis genetik molekul telah mengurangkan kekerapan yang telah dicadangkan sebelum ini kepada 1/4000 – 1/6000 orang bagi pesakit lelaki yang mengalami mutasi penuh dan menunjukkan ciri-ciri Fragile X (Murray *et al.*, 1996, Turner *et al.*, 1996, de Vries *et al.*, 1997, Crawford *et al.*, 1999). Kajian oleh Turner *et al.*, 1996, mencadangkan bahawa kekerapan pesakit perempuan yang mengalami mutasi penuh adalah pada jumlah yang hampir sama dengan pesakit lelaki namun kekerapan pesakit perempuan yang

menunjukkan tanda-tanda sindrom Fragile X adalah separuh daripada nilai kekerapan bagi pesakit lelaki.

1.2.2 Ciri-ciri fenotip.

Kajian yang pertama (Martin dan Bell, 1943), telah menerangkan tentang penyakit kerencatan akal yang berlaku pada seorang kanak-kanak dan diwariskan mengikut corak pewarisan terangkai kromosom X (*X-linked*) berasaskan kepada kajian salasilah keluarga pesakit tersebut. Beberapa penemuan awal dan penting seperti penemuan penanda kromosom pada kromosom X iaitu tapak rapuh kromosom X atau FRAXA (Lubs, 1969; diungkap dalam Pembrey *et al.*, 2001), dan penjelasan tentang penggunaan media khusus yang boleh merangsang pengekpresan tapak rapuh pada kromosom X (Sutherland, 1977), telah merangsang ramai penyelidik untuk mengkaji semula fail pesakit yang mengalami kerencatan akal bersifat familial yang tidak khusus. Kajian-kajian yang dijalankan selanjutnya telah berjaya menjelaskan ciri-ciri klinikal pesakit yang menghidap sindrom Fragile X.

Pesakit yang menghidap sindrom Fragile X secara klinikalnya menunjukkan ciri-ciri fenotip yang mempunyai variasi yang tinggi dari satu kes berbanding kes yang lain. Ciri klinikal utama yang di manifestasi oleh pesakit lelaki dewasa ialah ciri terencat akal sama ada pada tahap yang sederhana atau parah, dengan nilai tahap kecerdasan (*IQ*) 40–70 (Sutherland dan Hecht 1985). Ciri autisme merupakan ciri primer yang digunakan bagi mendiagnosis pesakit sindrom Fragile X terutama di kalangan pesakit lelaki. Pesakit perempuan didapati kurang parah berbanding pesakit lelaki termasuklah darjah

kegagalan fungsi mental, masalah perangai dan kurang ciri dismorfik (Sutherland dan Richards, 1995).

Fenotip lain yang kerap dilihat ialah ciri-ciri dismorfik seperti muka yang panjang dan bujur, dan menjadi kasar, bentuk muka yang bujur dan panjang, makroorkidisma, telinga lebar dan besar, dahi yang luas, bersuara nyaring dan *jocular speech* (Turner *et al.*, 1975; Sutherland *et al.*, 1979; Turner *et al.*, 1980, dan Hagerman, 1996). Selain itu terdapat juga pesakit yang mengalami ketidaknormalan tisu penyambung yang menyebabkan keadaan hipermobiliti pada sendi mereka. Ciri fenotip am yang turut ditemui dalam beberapa kajian ialah ketidaknormalan EEG (Opitz dan Sutherland 1984; dan Fryns, 1988). Ciri kerencatan akal, makroorkidisma dengan simptom tambahan, psikosis dan tanda piramidal telah dilaporkan berlaku pada pesakit terencat akal terangkai kromosom X yang terletak pada lokus Xq28. Namun begitu pesakit lelaki tidak menunjukkan perubahan pada tapak rapuh yang terletak pada bahagian distal kromosom X atau peningkatan ulangan CGG pada lokus FRAXA (Lindsay *et al.*, 1996).

Secara perbandingan, pada umumnya ciri fenotip pada pesakit perempuan yang menghidap sindrom Fragile X adalah kurang parah berbanding pesakit lelaki (Fryn, 1988; dan Sutherland and Richards, 1995). Beberapa kajian membuktikan bahawa perempuan yang membawa pramutasi Fragile X mempunyai risiko yang tinggi untuk mendapat kegagalan ovari pra-matang sebelum mereka berumur 40 tahun, namun keadaan ini tidak direkodkan berlaku pada pembawa mutasi penuh Fragile X yang berada dalam kumpulan umur yang sama (Murray *et al.*, 1998, dan Macpherson *et al.*, 1999).

Di samping terdapat pesakit yang ditemui tidak menunjukkan ciri-ciri umum yang biasa dilihat pada pesakit sindrom Fragile X sebaliknya menunjukkan ciri yang terdapat pada penyakit lain seperti sindrom Prader Willi (de Vries and Niermeijr, 1994) dan sindrom Sotos (Beemer *et al.*, 1986). Sub-fenotip yang menyerupai ciri sindrom Prader-Willi dengan keadaan obesiti melampau telah dilaporkan berlaku pada kanak-kanak yang menghidap sindrom Fragile X (de Vries *et al.*, 1997 dan Schrander-Stumpel *et al.*, 1994). Manakala satu kajian lain (Meryash *et al.*, 1984) telah melaporkan penemuan ciri makrosipali dan *dolichocephalic* dalam kira-kira 70-90% daripada mereka yang menghidapi sindrom Fragile X. Terdapat kalangan pembawa sindrom Fragile x perempuan yang mempunyai tahap kecerdasan (*IQ*) normal tetapi mempunyai tanda-tanda peningkatan risiko masalah psikiatri seperti skizofrenia (Hagerman and Sobeskey, 1989).

Ketidaknormalan tingkah laku kerap diperhatikan berlaku pada pesakit Fragile X lelaki dan kadang kala pada pesakit perempuan. Antara ketidaknormalan tersebut ialah tingkah laku yang menyerupai ciri autistik seperti *hand-flapping* dan *biting*, *rocking*, *poor eye contact* dan *repetitive speech patterns*, *perseveration* dan *echolalia* (Fryns 1988, Reiss dan Freund 1992). Pesakit kanak-kanak lelaki yang belum baligh umumnya menunjukkan ciri hiperaktif, kegagalan tumpuan, kegagalan pembelajaran dan kelewatan menguasai bahasa (*delay in learning language*) kerap digunakan sebagai tanda awal mereka mungkin menghidap sindrom Fragile X (Sudhalter *et al.*, 1991).

Ciri klinikal pesakit Fragile X adalah bervariasi. Sebagai contohnya; tidak semua petanda atau simptom sama ada ciri fizikal atau tingkah laku ditunjukkan oleh semua pesakit. Petanda somatik pula akan kelihatan lebih ketara selepas mereka baligh. Ciri-

ciri kecacatan fizikal pada tisu penyambung yang dialami oleh pesakit sindrom ini termasuklah keadaan *hyperextensible* pada sendi jari, dan ketidakstabilan sendi (Opitz *et al.*, 1984), *hipotonia*, *miopa*, *flat feet (pes planus)* *mitral valve prolapse* dan *mild dilatation of ascending aorta* (Pyeritz *et al.*, 1982).

Pada tahun 1993, Staley *et al.*, telah menunjukkan bahawa tahap kecerdasan bagi lelaki mozek (mempunyai genotip mutasi penuh dan pramutasi) adalah lebih tinggi berbanding pesakit lelaki yang hanya mengalami mutasi penuh. Pesakit perempuan sindrom Fragile X menunjukkan ciri-ciri yang kurang parah berbanding pesakit lelaki (Sutherland and Richards, 1995). Keadaan ini mungkin disebabkan oleh penyahaktifan kromosom X. Ciri-ciri seperti kegagalan mental dan masalah tabiat kerap berlaku pada tahap yang sederhana (Hagerman, 1996). Rousseau (1994), menunjukkan bahawa kira-kira 50% - 60% perempuan pembawa mutasi penuh menghidap *cognitive impairment* pada tahap sederhana hingga ke paras sempadan tahap parah. Individu perempuan pembawa yang mempunyai satu alel mutasi penuh dan menghidap kerencatan akal akan mempunyai bilangan ulangan CGG yang lebih besar berbanding mereka yang tidak menghidapi kerencatan akal.

Schwartz (1984), telah melaporkan bahawa kira-kira 21% daripada individu perempuan pramutasi dan 38% daripada pembawa mutasi penuh mengalami menopause awal iaitu sebelum berumur 40 tahun. Partington *et al.*, (1996), telah menerangkan bahawa pembawa sindrom Fragile X mempunyai umur median menopause 6 hingga 8 tahun lebih awal daripada perempuan dalam populasi umum.

Premature Ovarian Failure atau ringkasnya POF telah dikenal pasti berlaku pada individu perempuan pembawa pramutasi dalam tiga generasi daripada satu keluarga yang mempunyai kes sindrom Fragile X (Vianna – Morgante *et al.*, 1996). POF juga ditemui berlaku pada pesakit yang mempunyai delesi terminal pada kromosom X nya, iaitu pada lokus Xq26 – q28 (Tharapel *et al.*, 1993). Disebabkan keadaan regresi transkripsi bagi gen FMR1 sering berlaku pada keadaan yang mempunyai mutasi penuh, maka keadaan POF yang berlaku pada individu pramutasi sindrom Fragile X dianggap berlaku bukan disebabkan oleh kehilangan fungsi gen FMR1, tetapi mungkin disebabkan oleh keadaan delesi atau kehilangan fungsi bagi gen penting yang mengawal fungsi ovari yang terletak dalam kawasan lokus gen FMR1.

Ketidaknormalan neurologi yang kadang-kadang berlaku pada pesakit sindrom ini ialah *strabismus*, *nystagmus* dan epilepsi (Partington, 1984). Ciri *seizures* boleh diperhatikan berlaku pada kira-kira 17% pesakit lelaki berasaskan kepada data ujian fisiologi elektro (Hagerman, 1996). Kajian dengan menggunakan MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) menunjukkan terdapat perbezaan yang signifikan saiz yang lebih kecil posterior cerebellar vermis pada pesakit sindrom ini berbanding individu kawalan (Reiss *et al.*, 1995). Dapatan ini telah menyokong teori gangguan terhadap interaksi *frontal-subcortical* dalam kes sindrom Fragile X yang mungkin menjadi asas kepada penjelasan kepada kegagalan sikap pada pesakit (Hagerman, 1996).

Oleh itu kaedah diagnosis sindrom Fragile X menjadi agak sukar jika diasaskan kepada ciri-ciri klinikal sahaja terutama bagi pesakit yang belum baligh. Untuk membantu proses penyaringan pesakit, Butler *et al.*, 1991, Hagerman *et al.*, 1991, Arvio *et al.*, 1997, telah mencadangkan senarai uji yang dibina berasaskan kepada penilaian dan pengiraan

ciri-ciri fizikal dan tingkah laku pesakit. Namun kaedah ini tidak mendapat sambutan yang meluas mungkin disebabkan oleh ketepatan keputusan yang terhad. Rousseau *et al.*, 1994 telah mendakwa bahawa dengan menggunakan kaedah diagnosis DNA terdapat hubung kait yang kuat di antara saiz ulangan jujukan CGG dengan penemuan sitogenetik dan ciri-ciri klinikal pesakit yang dikaji.

1.2.3 Corak pewarisan.

Umumnya sindrom Fragile X diwariskan sebagai suatu penyakit yang terangkai kromosom-X dengan corak pewarisan yang unik. Sindrom ini tidak boleh dikelaskan secara tidak sama rata (*unequivocally*) sebagai dominan atau resesif. Keadaan ini ditunjukkan oleh perempuan pembawa yang mungkin akan menghadapi kerencatan akal atau sebaliknya; keadaan yang sama berlaku pada pengekspresian tapak rapuh pada kromosom X selepas sel limfosit daripada individu tersebut dikulturkan.

Pesakit lelaki yang menghidap sindrom Fragile X secara tipikal nya akan menunjukkan ciri kerencatan akal, tetapi bagi pesakit perempuan heterozigos, kemungkinan untuk mereka menghidap kerencatan akal adalah sebanyak 30 – 35% (Sherman *et al.*, 1985). Oleh itu, seseorang perempuan heterozigos pembawa kepada sindrom Fragile X yang diwarisi sebagai resesif kromosom X, didapati jarang menghidap penyakit ini atau jika menghidap sekalipun, hanya menunjukkan ciri '*mild* pembawa' dan ini mungkin disebabkan oleh proses *skewed X-inactivation* (Mingroni-Netto *et al.*, 1994). Bagi seorang lelaki yang hemizigos kromosom X, sepatutnya penembusan berlaku dengan sempurna kerana mereka hanya mempunyai satu kromosom X. Namun dalam kes sindrom Fragile X, terdapat pembahagian yang bermakna iaitu kira-kira 1/3 daripada perempuan pembawa akan menghidap penyakit ini (Turner *et al.*, 1986). Selain itu, lelaki pembawa yang normal turut ditemui (Howard-Peebles and Friedman 1985). Analisis segregasi terhadap 206 keluarga Fragile X yang telah dilakukan oleh Sherman *et al.*, 1984, 1985 menunjukkan bahawa berlaku pengurangan jumlah pesakit lelaki sebanyak 20%, dan ini menerangkan bahawa kadar penembusan mutasi pada pesakit lelaki berkurangan sebanyak 80%. Lelaki pembawa 'tidak tembus' ini turut dikenali

sebagai '*transmitting male*'. Kajian oleh Sherman (1984) menunjukkan bahawa penyakit sindrom Fragile X adalah sejenis penyakit yang terangkai kromosom X dominan dengan penembusan yang menurun atau tidak sempurna (*reduced or incomplete penetrance*). Walau bagaimanapun risiko *mental impairment* didapati bergantung kepada kedudukan seseorang pesakit dalam salasilah keluarganya dan juga ciri fenotip ibu pesakit yang juga seorang pembawa seperti berikut; 1) anak perempuan kepada lelaki transmitting yang menjadi pembawa obligasi tidak mempunyai risiko terhadap *mental impairment*; 2) anak kepada lelaki *transmitting* mempunyai risiko relatif yang rendah iaitu 9% dan 5% yang mengakibatkan penembusan masing-masing sebanyak 18% dan 10% bagi lelaki dan perempuan; 3) Anak lelaki dan perempuan kepada seorang pembawa perempuan yang normal mempunyai risiko sebanyak risiko sebanyak 18% dan 16% yang mengakibatkan penembusan sebanyak 72% dan 32%, dan 4; anak-anak kepada pembawa perempuan yang '*mentally impaired*' mempunyai risiko untuk menghidap '*mentally handicapped*' sebanyak 50% bagi lelaki dan 28% bagi perempuan dan keadaan ini mengakibatkan nilai penembusan masing-masing sebanyak 100% dan 56%. Nilai ini telah berjaya menerangkan bahawa sindrom Fragile X merupakan sejenis penyakit yang terangkai kromosom X dominan yang unik dan sukar.

Beberapa mekanisme telah dicadangkan untuk menerangkan corak pewarisan dan pengekspresian unik gen yang bertanggungjawab dalam sindrom Fragile X. Salah satu teori yang telah dicadangkan ialah teori pramutasi iaitu sesuatu pramutasi itu berlaku akibat penyusunan semula secara mikro kromosom pada lokus FRAXA, yang diwarisi melalui perempuan dan akan mendedahkan individu tersebut kepada mutasi sebenar (Pembrey *et al.*, 1985). Teori lain mencadangkan jika berlaku kegagalan setempat untuk mengaktifkan semula kromosom Fragile X ibu sebelum proses oogenesis bermula,

maka akan menyebabkan berlaku pemetilan yang tinggi pada tapak Fragile X (Xq27.3) dan menyebabkan proses penyahaktifan transkripsi gen FMR1 (Laird *et al.*, 1990).

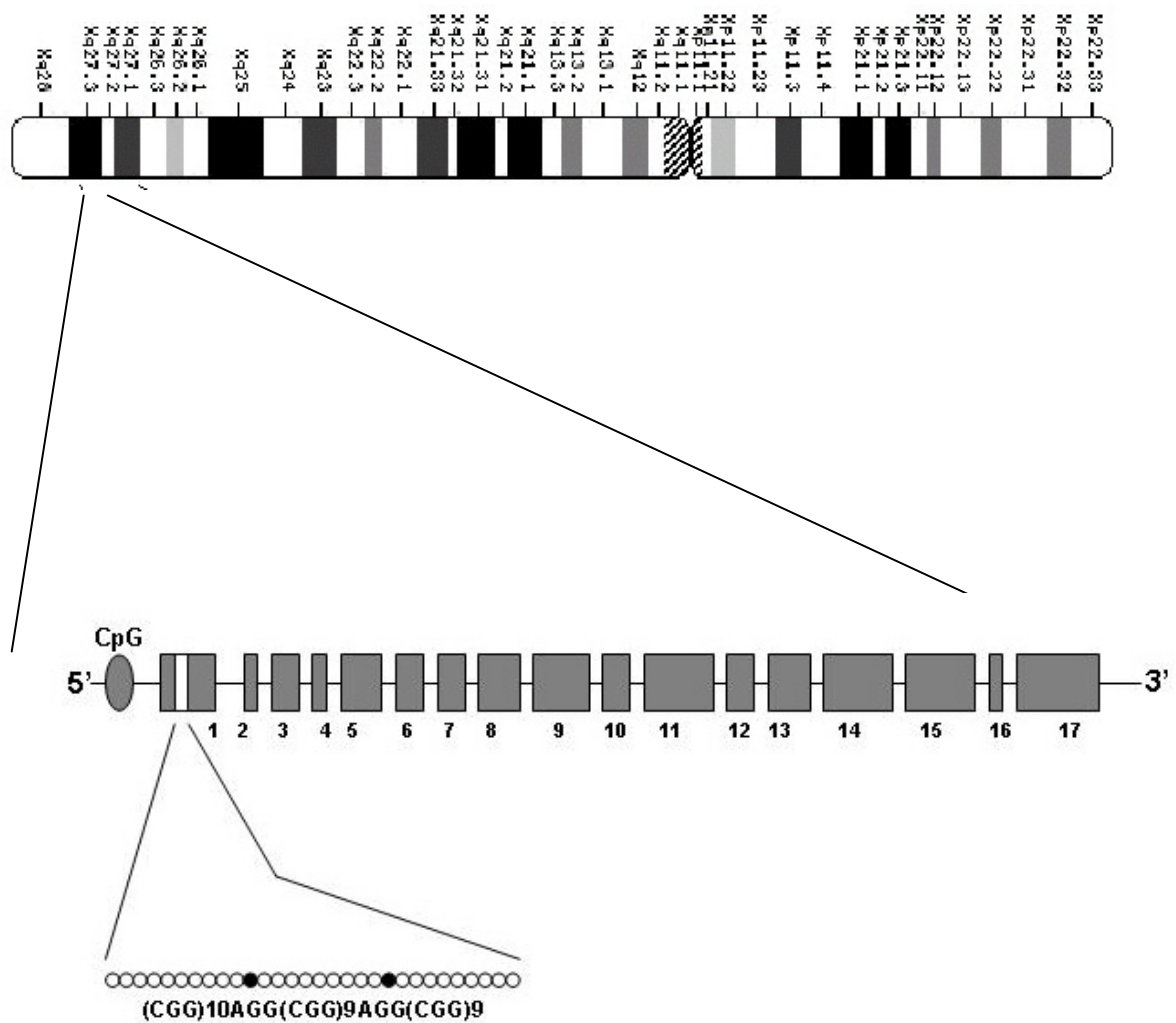
Namun begitu corak pewarisan yang agak ganjil dan unik dengan risiko berlaku *mental impairment* yang semakin bertambah pada setiap generasi berikutnya dirujuk sebagai paradoks Sherman atau antisipasi. Sebagai perbandingan, secara umumnya, dalam penyakit yang diwarisi sebagai terangkai kromosom X, ciri-ciri tipikal penyakit tersebut akan diekspresikan pada individu lelaki hemizigot, dan lelaki yang tidak terlibat tidak akan mewariskan penyakit tersebut kepada generasi berikutnya sama ada lelaki atau perempuan. Keadaan sebaliknya berlaku dalam sindrom Fragile X. Individu lelaki yang pada hakikatnya merupakan seorang pembawa mutasi, didapati tidak menunjukkan ciri kerencatan akal dan tidak mengekspresikan tapak rapuh kromosom X semasa analisis sitogenetik. Individu ini dianggap sebagai '*non-expressing normal transmitting male*' yang akan mewariskan gen ini kepada kesemua anak perempuannya. Kajian juga mendapati selalunya, anak – anak perempuan ini mempunyai nilai intelek atau kecerdasan yang normal, namun anak lelaki mereka dijangka akan mempunyai kemungkinan untuk menghidap kerencatan akal. Asas molekul yang menjadi penyebab berlakunya sindrom Fragile X merupakan kunci kepada kefahaman terhadap teori yang dicadangkan di atas.

1.3 Struktur dan fungsi gen Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1).

Hasil kajian yang dibuat (Fu *et al.*, 1991) telah berjaya memetakan gen yang terlibat dengan sindrom Fragile X dengan menggunakan kaedah pengklonan posisi (*positional cloning*), dan kemudiannya dikenali sebagai gen FMR1. Gen ini mempunyai saiz 38 kb

dan terdiri daripada 17 ekson (Gambar rajah 1.1). Intron pertama gen ini sangat besar iaitu sepanjang 9.9 kb yang merangkumi kira-kira satu pertiga ($1/3$) daripada keseluruhan gen ini. Manakala intron terkecil ialah terletak di antara ekson VIII dan ekson IX dengan saiz 88 bp.

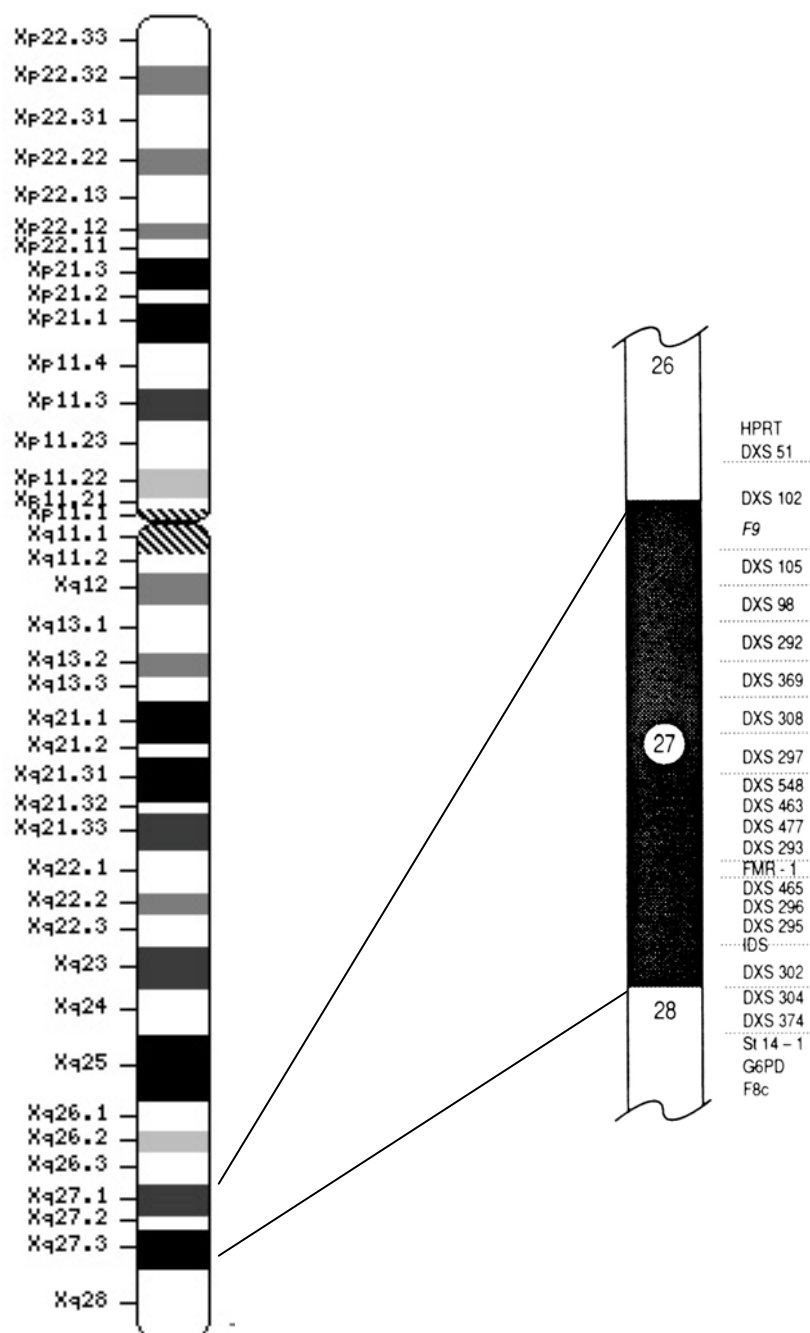
Gen FMR1 ini kemudiannya didapati mempunyai mRNA sepanjang 4.0 kb yang terdiri daripada 1.9 kb jujukan pengkodan yang menghasilkan protein yang terdiri daripada 631 asid amino (Verkerk *et al.*, 1991). Kajian seterusnya mendapati jujukan 5' *Untranslated region* (UTR), juga mempunyai saiz yang besar dan melebihi purata saiz panjang ekson, (112 bp) iaitu 318 bp . (Eichler *et al.*, 1993). Kawasan yang tidak mengkodkan protein pada hujung 5' gen ini mempunyai jujukan ulangan trinukleotida yang berulang secara tandem dan terletak 250 bp daripada kawasan pulau CpG. Kawasan ini kemudiannya didapati bertanggungjawab terhadap kewujudan tapak rapuh pada hujung kromosom X.



Gambar rajah 1.1 Struktur dan organisasi gen FMR1. Jujukan ulangan trinukleotida CGG terletak dalam ekson 1 dalam kawasan 5'UTR. Pulau CpG yang terletak 250 bp hulu daripada ulangan pertama CGG, yang akan merencatkan pengekspresian atau proses transkripsi gen ini akibat pemetilan hiper pulau ini (Eichler *et al.*, 1993). Gen FMR1 terdiri daripada 17 ekson (segi empat gelap). Segi empat putih mewakili kawasan ulangan jujukan trinukleotida CGG. Bentuk bulat mewakili ciri ulangan jujukan trinukleotida dalam individu normal dan mempunyai 28 ulangan CGG dan dua jujukan AGG yang terselit selepas CGG₁₀ dan selepas itu (CGG)₉ yang berikutnya. Rajah diadaptasi daripada Eichler *et al.*, (1993).

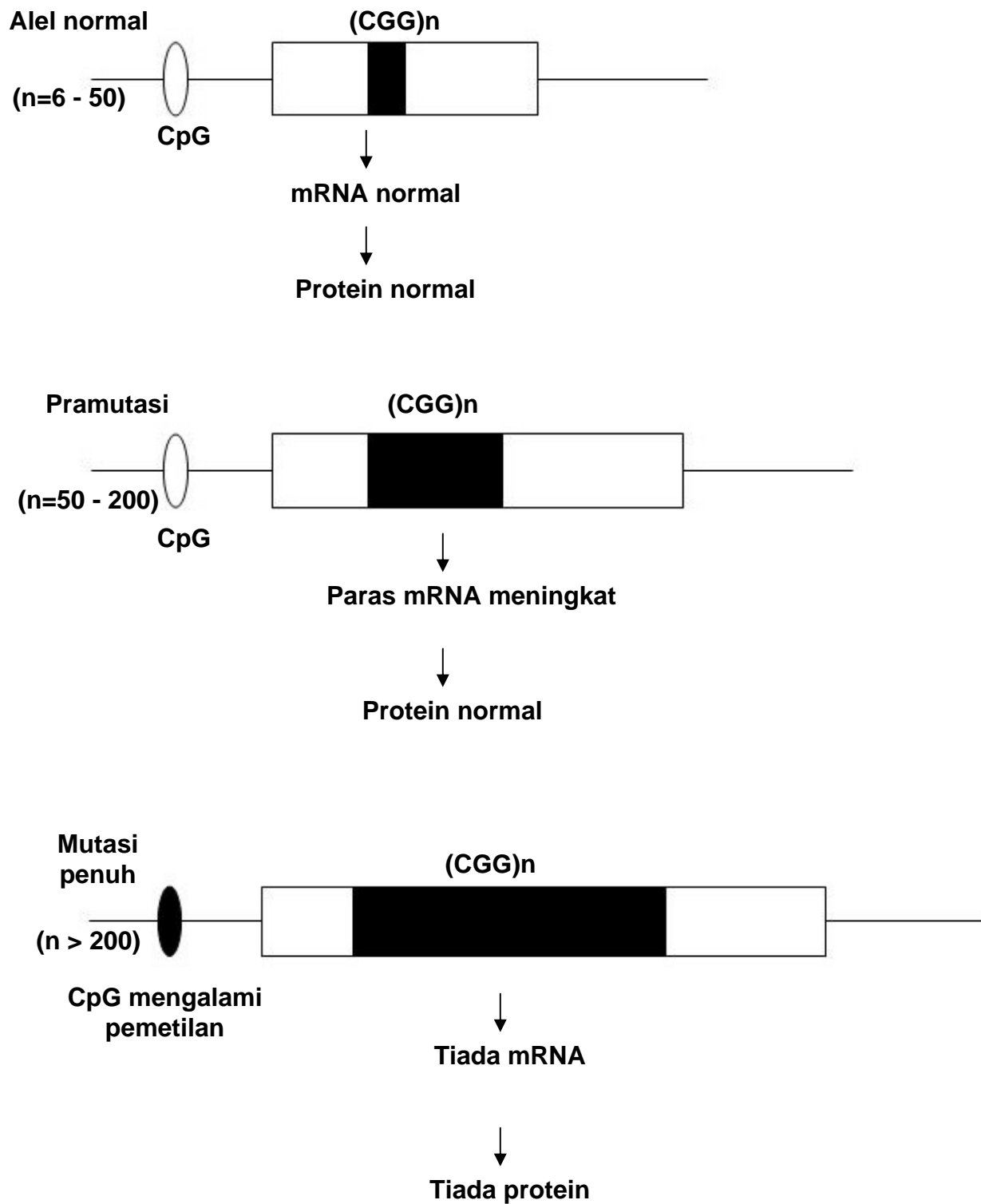
Gen FMR1 dalam keadaan normal akan menghasilkan protein yang dipanggil *Fragile X Mental Retardation Protein* atau ringkasnya FMRP. Ia merupakan sejenis protein pengikat RNA bersaiz 68-70 KD. Kajian juga mendapati protein ini pada amnya diekspresikan pada semua sel namun mempunyai paras pengepresan yang lebih tinggi di otak dan testis (Tamanini *et al.*, 1997). Satu kajian telah dilakukan bagi melihat fungsi FMRP dan mendapati protein ini dikaitkan dengan beberapa mRNA yang terlibat dengan fungsi neuronal seperti proses pengangkutan vasikel, transduksi signal dan lain-lain. Tanpa kehadiran FMRP, mRNA –mRNA ini akan menjadi tidak terkawal dan akhirnya menyebabkan keadaan kerencatan akal pada subjek kajian. (Mittal *et al.*, 2002).

Dalam keadaan normal, gen ini mereplikasi dalam fasa S kitaran sel, manakala bagi gen yang mempunyai alel yang tidak normal, di mana bilangan ulangan jujukan trinukleotida CGG telah bertambah, maka ia akan mereplikasi dalam fasa G2/M (Laird *et al.*, 1987). Jujukan trinukleotida CGG menunjukkan ciri polimorfik dalam populasi dengan individu normal mempunyai 6 hingga 52 ulangan (18 hingga 156 pasangan bes) dan selalunya diselangi oleh jujukan AGG dalam setiap 9 atau 10 ulangan jujukan CGG (Kunst dan Warren, 1994; Eichler *et al.*, 1994; Snow *et al.*, 1994; Hirst *et al.*, 1994). Zon kelabu bagi alel FRAXA (35 hingga 52 ulangan) mewakili kawasan yang mempunyai saiz ulangan bertindih iaitu jarak ulangan paling tinggi tapi masih normal dalam populasi umum dan ulangan paling rendah alel pramutasi dalam sesuatu keluarga yang mempunyai pesakit sindrom Fragile X. Alel-alel tersebut boleh wujud sebagai berada dalam keadaan stabil atau tidak stabil (Fu *et al.*, 1991; Eichler *et al.*, 1994; Montagnon, 1994).



Gambar rajah 1.2. Kromosom X dan lokasi gen FMR1 pada lokus Xq27.3 serta lokus beberapa mikrosatelit yang terletak berdekatan dengan lokus gen FMR1. Gambar rajah diadaptasi dari ideogram diperoleh dari Genbank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?ORG=hum&MAPS=ideogr,est,loc&LINKS=ON&VEBOSE=ON&CHR=X>)



Gambar rajah 1.3. Mekanisma mutasi dalam sindrom Fragile X. Individu normal mempunyai bilangan ulangan CGG daripada 5 – 52 kali. Peningkatan ulangan ini menghasilkan keadaan pramutasi yang dicirikan oleh bilangan CGG daripada 52 – 200 kali dan tidak stabil. Peningkatan seterusnya menyebabkan keadaan mutasi penuh dengan bilangan ulangan melebihi 200 kali. Pada tahap ini CpG akan mengalami pemetilan dan ia akan merencatkan proses transkripsi mRNA gen FMR1 dan akibatnya tiada protein FMRP dihasilkan.

1.4 Mutasi yang menyebabkan sindrom Fragile X.

1.4.1 Peningkatan jujukan ulangan trinukleotida.

Jujukan ulangan trinukleotida merupakan salah satu jujukan yang berulang secara tandem dan juga dikenali sebagai penanda mikrosatelit. Ia adalah salah satu sumber polimorfisma jujukan DNA dalam genom eukariot (Weber and May, 1989). menyimpulkan bahawa Mutasi yang melibatkan peningkatan jujukan ulangan trinukleotida (Gambar rajah 1.3) merupakan penyebab kepada beberapa penyakit neurogenetik dan terdapat 7 penyakit yang telah dikenaplasti iaitu; sindrom Fragile X, *myotonic dystrophy*, *spinal* dan *bulbar atrophy* terangkai kromosom X, penyakit Huntington, spinocerebellar ataksia (jenis I), *dentatorubral-pallidolulsian atrophy* dan penyakit Machado-Joseph. (Paulson and Fischbeck, 1996). Kajian juga mendapati terdapat 14 penyakit neurologi berpunca daripada keadaan peningkatan jujukan trinukleotida .(Cummings and Zoghbi, 2000). Mereka membahagikan kepada dua subkelas berasaskan kepada lokasi jujukan trinukleotida : iaitu penyakit yang melibatkan peningkatan ulangan jujukan trinukleotida pada kawasan tidak diterjemahkan (*non-coding sequences*) dan penyakit yang melibatkan peningkatan jujukan ulangan trinukleotida dalam kawasan jujukan mengkodan (*exonic*).

Analisis terhadap variasi bilangan ulangan CGG pada individu normal telah menunjukkan terdapat variasi pada saiz ulangan CGG (Gambar rajah 1.3) bermula daripada 6 hingga 52 ulangan (Fu *et al.*, 1991). Alel yang paling kerap ditemui ialah ulangan 29/30 dan merupakan alel yang mempunyai nilai polimorfisma yang tinggi dalam populasi individu normal. Alel ulangan trinukleotida CGG yang berada di dalam jarak normal akan wujud sebagai penanda mikrosatelit dan wujud dalam keadaan yang stabil semasa

transmisi (Fu *et al.*, 1991, Snow *et al.*, 1993). Analisis terhadap ulangan CGG menunjukkan bahawa dalam kebanyakan alel normal, terdapat jujukan ulangan trinukleotida AGG yang menyelit (*interrupted*), dan terletak di antara blok ke 9 atau 10 ulangan trinukleotida CGG (Chen *et al.*, 1997). Majoriti alel normal adalah terdiri daripada ulangan CGG 5-50 kali dan mempunyai dua atau lebih jujukan selitan AGG, manakala kebanyakan alel pramutasi (50-200 ulangan) hanya mempunyai satu atau tiada jujukan selitan ini (Eichler *et al.*, 1995; Hirst *et al.*, 1994; Kunst dan Warren 1994, dan Zhong *et al.*, 1995). Satu postulasi telah diterbitkan dengan menganggap jujukan selitan trinukleotida AGG ini berfungsi untuk menstabilkan jujukan ulangan trinukleotida CGG (Eichler *et al.*, 1995; Hirst *et al.*, 1994 dan Kunst and Warren 1994).

Bilangan ulangan CGG bagi pesakit sindrom Fragile X dan juga individu pembawa dalam keluarga Fragile X adalah melebihi bilangan jarak normal. Mutasi dalam sindrom Fragile X dikelaskan mengikut saiz ulangan dan status pemetilan jujukan CGG. Bagi jujukan CGG yang mempunyai ulangan di antara 50 hingga 200 kali, ia dikelaskan sebagai pramutasi, manakala ulangan yang melebihi 200 kali dikelaskan sebagai mutasi penuh dengan pemetilan hiper yang berlaku pada kawasan pulau CpG gen FMR1. Mutasi penuh dikesan berlaku pada pesakit sindrom Fragile X dan juga pada sesetengah perempuan yang menjadi pembawa tetapi tidak menghidap sindrom ini, dan pramutasi tidak akan menunjukkan sebarang petanda penyakit bagi individu tersebut (Fu *et al.*, 1991; Rousseau *et al.*, 1991 dan Yu *et al.*, 1992).

1.4.2 Mekanisma Mutasi yang menghasilkan peningkatan jujukan ulangan CGG.

Mekanisma sebenar bagaimana peningkatan jujukan ulangan trinukleotida CGG berlaku masih belum difahami sepenuhnya. Namun terdapat hipotesis yang cuba menerangkan keadaan ini. Worhle *et al.*, (1993) mencadangkan masa berlakunya fenomena ini adalah semasa proses mitosis yang berlaku selepas pembentukan zigot. Hipotesis lain menyatakan bahawa proses peningkatan ulangan berlaku semasa proses meiosis dan hanya berlaku semasa peringkat oogenesis. Hipotesis ini dilihat konsisten dengan pemerhatian bahawa tidak berlaku keadaan peningkatan kepada mutasi penuh pada anak-anak lelaki yang membawa alel pramutasi atau dikenali juga sebagai *normal transmitting male (NTM)*.

Reyneir *et al.*, (1993) pula mencadangkan bahawa lelaki yang mengalami mutasi penuh hanya akan membawa alel pramutasi dalam sel gamet mereka, dan kenyataan ini dijadikan bukti kepada hipotesis yang mengatakan peningkatan jujukan ulangan adalah berlaku semasa mitosis. Namun kajian oleh Malter *et al.*, (1997) mendapati sel sel testis pada fetus yang mengalami mutasi penuh seawal berumur 13 minggu dan hanya mempunyai alel mutasi penuh dan tiada alel pramutasi.

Mornet *et al.*, (1996) melaporkan penemuan mereka pada satu keluarga yang menunjukkan corak transmisi alel pramutasi yang tidak dijangka daripada ibu kepada tiga orang anak perempuannya dan kejadian mutasi yang berulang (*recurrent*). Anak perempuan pertamanya menunjukkan ciri mozek dengan dua alel pramutasi. Anak perempuan keduanya menunjukkan keadaan terbalik iaitu pengurangan alel pramutasi daripada ibunya kepada alel normal. Anak perempuan ketiganya menunjukkan ciri saiz

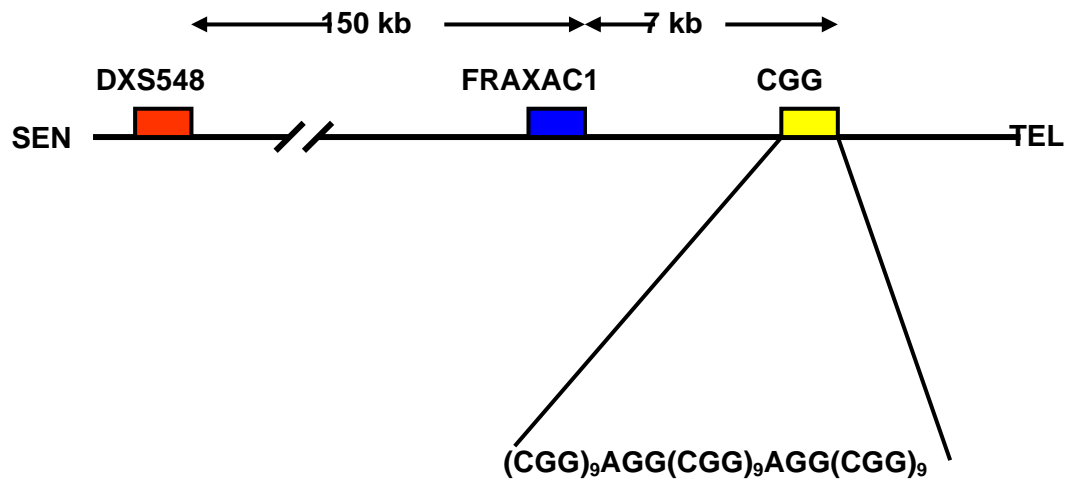
alel pramutasi yang lebih besar berbanding ibunya. Beliau menyimpulkan keadaan yang wujud pada keluarga ini mungkin berlaku disebabkan oleh beberapa faktor yang berbeza seperti; kegelinciran (slippage) fungsi DNA polimerase dalam proses replikasi, atau berlaku pengecutan yang besar pada jujukan ulangan CGG semasa proses replikasi dalam kedua ibu bapa mereka, atau disebabkan oleh rekombinasi yang terhasil melalui silangan yang tidak sama rata pada kromatid beradik mereka.

Gasteiger *et al.*, (2003) menemui fenomena mutasi terbalik dalam kajian beliau terhadap satu keluarga yang mempunyai 2 anak lelaki dan seorang anak perempuan yang menghidap sindrom Fragile X dan 2 lagi anak perempuan yang normal. Seorang daripada anak perempuan mempunyai alel 10 CGG yang tidak didapati sama ada pada ibu atau ayahnya. Analisis haplotaip selanjutnya menunjukkan alel 10 CGG ini diwarisi daripada ibunya. Keadaan ini dianggap sebagai satu proses mutasi terbalik daripada alel pramutasi daripada seorang perempuan kepada alel bersaiz normal dalam anaknya.

Di kalangan orang-orang Yahudi di Tunisia, kekerapan individu yang mempunyai bilangan ulangan jujukan trinukleotida CGG normal tetapi tidak mempunyai jujukan selitan CCT didapati semakin bertambah dan ini mengakibatkan kejadian sindrom Fragile X dalam kumpulan etnik ini menjadi semakin meningkat (Falik-Zaccai *et al.*, 1997).

1.4.3 Mutasi jujukan berulang dinukleotida (mikrosatelit) yang berdekatan dengan gen FMR1.

Peningkatan alel normal kepada alel pramutasi dan mutasi penuh menunjukkan keadaan linkage disequilibrium dan lokus mikrosatelit (Richards *et al.*, 1992) dan *single nucleotide polymorphisms* atau ringkasnya SNP's (Gunter *et al.*, 1998) yang terletak pada hujung 5' gen FMR1. Kajian oleh Huggins *et al.*, (2004) telah berjaya menunjukkan bahawa haplotaip DXS548-FRAXAC1 (Gambar rajah 1.4) dan juga keadaan keluarga seseorang pesakit boleh mempengaruhi transmisi jujukan ulangan CGG daripada emak kepada anak-anaknya. Kajian oleh Thelma dan Sharma, (2002) mendapati terdapat bilangan haplotaip yang pelbagai wujud di kalangan komuniti keturunan kasta di India seperti Brahmin, Kshatriyas, Vaishyas dan Shudras. Kajian selanjutnya oleh Sharma *et al.*, (2003) mengesahkan kepelbagaian haplotaip FRAXAC1 dan DXS548 hasil perbandingan beliau di antara kromosom yang mengalami sindrom Fragile X dan sampel kawalan disamping penemuan mereka tentang kesan pengasas yang lemah dalam populasi India.



Gambar rajah 1.4. Lokasi penanda haplotaip yang digunakan dalam kajian ini. Locus mikrosatelit DXS548 terletak kira-kira 157 kb dan locus mikrosatelit FRAXAC1 terletak 7kb daripada locus FRAXA (CGG). Rajah adaptasi daripada Eichler *et al.*, 1996.